

## ヒト口腔上皮細胞の口腔粘膜免疫調節機構と歯周病

著者	菅原 俊二
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/41311">http://hdl.handle.net/10097/41311</a>



---

# ヒト口腔上皮細胞の口腔粘膜免疫調節機構と 歯 周 病

---

研究課題番号 13671894

平成13年度～平成14年度科学研究費補助金

(基盤研究 (C) (2))

研究成果報告書

平成15年 3 月

研究代表者 菅 原 俊 二  
(東北大学大学院歯学研究科教授)

## は し が き

本研究は、口腔上皮細胞は単なるバリアーとして機能するだけでなく、歯周病という慢性炎症の一連の過程において、さまざまなサイトカインをアクティブに産生して、口腔粘膜への歯周病の病型に特徴的な炎症性細胞や免疫細胞の浸潤をコントロールし、口腔粘膜に特徴的な炎症病巣形成に重要な役割を演じているとの作業仮説を実証することを目的として計画し、主として次のような研究成果を得た。

- ヒト口腔上皮細胞のインターロイキン(IL)-18 の産生機構について検討した。IL-18 は IL-12 と相乗的に働きヘルパーT 細胞を 1 型 (Th1) にシフトさせる一方で、IL-12 非存在下では Th2 サイトカインとして働く重要なサイトカインの一つである。その結果、①ヒト口腔上皮細胞は IL-18 を 24 kDa の前駆体として細胞質内に発現すること、②インターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) で前処理した口腔上皮細胞を好中球セリンプロテアーゼの一つ proteinase 3 (PR3) と内毒素性リポ多糖 (LPS) との共存下で刺激した場合に活性型 IL-18 産生されることが明らかとなった。
- LPS は Toll-like receptor 4 (TLR4)/MD-2/MyD88 系を介して細胞を活性化する。次に、PR3 の活性化機構を詳細に検討した結果、プロテアーゼで活性化する G タンパク共役受容体ファミリーのうち protease-activated receptor-2 (PAR-2) を介して活性化することを初めて明らかにした。
- 口腔上皮細胞は腸管上皮細胞と同様に、細菌パターン認識レセプターである CD14 分子の発現は認められないが、各種菌体成分認識にかかわる TLRs/MD-2/MyD88 系の分子群を発現している。にもかかわらず、腸管上皮細胞とは異なり遊離型 CD14 の存在下でも多くの菌体成分に対して不応答性であった。これは、多種多様な微生物に常に晒されている口腔上皮細胞にとっては理にかなった現象と考えられる。一方、口腔上皮細胞は黒色色素産生菌 (BPB) の菌体成分 (線毛や糖タンパク) に対しては応答し、顆粒球コロニー刺激因子や顆粒球マクロファージコロニー刺激因子を産生するという知見を得た。さらに、口腔上皮細胞は IFN- $\gamma$  に晒されることにより TLRs/MD-2/MyD88 系分子群の発現亢進に伴い応答能を獲得することを明らかにした。このことは、口腔上皮細胞が、炎症局所において顆粒球や単球の集積・活性化に関わる重要な役割を演じていることを示唆している。
- BPB の糖タンパクは LPS とは異なり、TLR-2 を介して宿主細胞を活性化するとの知見も得た。おそらく、BPB の LPS 画分の特異的な活性は LPS 自体ではなく、標品に混入した微量の BPB 特異的な糖蛋白様物質に帰因すると考えられる。
- 各種菌体成分パターン認識受容体 CD14 を発現している歯肉線維芽細胞にも菌体成分応答能にかんして同様の機構があることを明らかにした。また、歯根膜線維芽細胞は歯肉線維芽細胞に比べ CD14 の発現が低い。TLR2 を強く発現し、歯肉線維芽細胞は主にグラム陰性菌の成分に、歯根膜線維芽細胞はグラム陽性菌の成分に応答能を有することも明らかにした。さらに、主要な歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* が産生するシステインプロテアーゼ (ジンジパイン) は歯肉線維芽細胞の発現する CD14 を特異的に分解し、CD14 依存性免疫応答を減弱させることにより、同菌の宿主自然免疫機構を回避する可能性を提示した。
- CD14 は唾液中にも存在し、唾液 CD14 は主として耳下腺に由来することも明らかとなった。耳下腺唾液 CD14 は血清に存在する量に匹敵し、腸管上皮細胞の LPS による活性化に関与する。

今後、解明しなければならない研究課題が数多く残されており、さらにこの機構について追求していきたい。

研究組織

研究代表者：菅原 俊二 （東北大学大学院歯学研究科教授）  
研究分担者：高田 春比古（東北大学大学院歯学研究科教授）  
研究分担者：根本 英二 （東北大学大学院歯学研究科助手）

交付決定額（配分額） (金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成13年度	1,800	0	1,800
平成14年度	1,800	0	1,800
総計	3,600	0	3,600

研究発表

(1) 学会誌等

\*1. Yang, S., S. Sugawara, T. Monodane, M. Nishijima, Y. Adachi, S. Akashi, K. Miyake, S. Hase, and H. Takada. *Micrococcus luteus* teichuronic acids activate human and murine monocytic cells in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. Infect. Immun. 69 (4): 2025-2030, 2001 年 4 月 1 日.

\*2. Yang, S., R. Tamai, S. Akashi, O. Takeuchi, S. Akira, S. Sugawara, and H. Takada. Synergistic effect of muramyldipeptide with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid to induce inflammatory cytokines in human monocytic cells in culture. Infect. Immun. 69 (4): 2045-2053, 2001 年 4 月 1 日.

\*3. Uehara, A., S. Sugawara, R. Tamai, and H. Takada. Contrasting responses of human gingival and colonic epithelial cells to lipopolysaccharides, lipoteichoic acids and peptidoglycans in the presence of soluble CD14. Med. Microbiol. Immunol. 189 (4): 185-192, 2001 年 4 月 1 日.

4. 菅原俊二, 上原亜希子. 好中球 proteinase 3 による活性型 IL-18 の誘導. 侵襲と免疫 10 (2): 53-58, 2001 年 5 月 31 日.

\*5. Sugawara, S., S. Yang, K. Iki, J. Hatakeyama, R. Tamai, O. Takeuchi, S. Akashi, T. Espevik, S. Akira, and H. Takada. Monocytic cell activation by non-endotoxic glycoprotein from *Prevotella intermedia* ATCC 25611 is mediated by Toll-like receptor 2. Infect. Immun. 69 (8): 4951-4957, 2001 年 8 月 1 日.

6. 菅原俊二, 高田春比古. 歯周病と CD14/Toll-like receptor 系. 炎症と免疫 9 (5): 575-581, 2001 年 8 月 20 日.

- \*7. Sugawara, S., A. Uehara, T. Nochi, T. Yamaguchi, H. Ueda, K. Hanzawa, A. Sugiyama, K. Kumagai, H. Okamura, and H. Takada. Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells. *J. Immunol.* 167 (11): 6568-6575, 2001 年 12 月 1 日.
- \*8. Sugiyama, A., A. Uehara, K. Iki, K. Matsushita, R. Nakamura, T. Ogawa, S. Sugawara, and H. Takada. Activation of human gingival epithelial cells by cell-surface components of black-pigmented bacteria: augmentation of production of interleukin-8, granulocyte colony-stimulation factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and expression of intercellular adhesion molecule 1. *J. Med. Microbiol.* 51 (1): 27-33, 2002 年 1 月 1 日.
- \*9. Tamai, R., T. Sakuta, K. Matsushita, M. Torii, O. Takeuchi, S. Akira, S. Akashi, T. Espevik, S. Sugawara, and H. Takada. Human gingival CD14<sup>+</sup> fibroblasts primed with gamma interferon increase production of interleukin-8 in response to lipopolysaccharide through up-regulation of membrane CD14 and MyD88 mRNA expression. *Infect Immun.* 70 (3): 1272-1278, 2002 年 3 月 1 日.
10. 菅原俊二, 高田春比古. 口腔粘膜とサイトカインネットワーク. 炎症と免疫 10 (3): 221-227, 2002 年 4 月 20 日.
- \*11. Tada, H., S. Sugawara, E. Nemoto, N. Takahashi, T. Imamura, J. Potempa, J. Travis, H. Shimauchi, and H. Takada. Proteolysis of CD14 on human gingival fibroblasts by arginine-specific cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis* leading to down-regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production. *Infect. Immun.* 70 (6): 3304-3307, 2002 年 6 月 1 日.
- \*12. Tada, H., E. Nemoto, H. Shimauchi, T. Watanabe, T. Mikami, T. Matsumoto, N. Ohno, H. Tamura, K. Shibata, S. Akashi, K. Miyake, S. Sugawara, and H. Takada. *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida albicans*-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. *Microbiol. Immunol.* 46 (7): 503-512, 2002 年 7 月 1 日.
- \*13. Uehara, A., S. Sugawara, and H. Takada. Priming of human oral epithelial cells by interferon-gamma to secrete cytokines in response to lipopolysaccharides, lipoteichoic acids and peptidoglycans. *J. Med. Microbiol.* 51 (8): 626-634, 2002 年 8 月 1 日.
14. Aiba, S., Z. Uddin, S. Nakagawa, S. Sugawara, H. Rikiishi, K. Kumagai, and H. Tagami. Decreased IL-10 production by psoriatic peripheral blood mononuclear cells stimulated with streptococcal superantigen. *Exp. Dermatol.* 11 (4): 337-343, 2002 年 8 月 1 日.
- \*15. Uehara, A., S. Sugawara, K. Muramoto, and H. Takada. Activation of human oral epithelial cells by neutrophil proteinase 3 through protease-activated receptor-2. *J. Immunol.* 169 (8): 4594-4603, 2002 年 10 月 15 日.



- \*16. Sugawara, S., A. Uehara, R. Tamai, and H. Takada. Proceedings. Innate immune responses in oral mucosa. J. Endotoxin Res. 8 (6): 465-468, 2002 年 12 月 1 日.
- \*17. Hatakeyama, J., R. Tamai, A. Sugiyama, S. Akashi, S. Sugawara, and H. Takada. Contrasting responses of human gingival and periodontal ligament fibroblasts to bacterial cell-surface components through the CD14/Toll-like receptor system. Oral Microbiol. Immunol. 18 (1): 14-23, 2003 年 1 月 1 日.
- \*18. Uehara, A., S. Sugawara, K. Watanabe, S. Echigo, M. Sato, T. Yamaguchi, and H. Takada. Constitutive expression of a bacterial pattern recognition receptor, CD14, in human salivary glands and secretion as a soluble form in saliva. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 10 (2): 286-292, 2003 年 3 月 1 日.
- \*19. Tamai, R., S. Sugawara, O. Takeuchi, S. Akira, and H. Takada. Synergistic effect of lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$  in inducing interleukin-8 production in human monocytic THP-1 cells is accompanied by up-regulation of CD14, Toll-like receptor 4, MD-2 and MyD88 expression. J. Endotoxin Res. 9 (2): 印刷中, 2003 年 3 月 31 日.

## (2) 口頭発表

- 1. 上原亜希子, 菅原俊二, 高田春比古. インターフェロンガンマーで前処理した口腔上皮細胞の菌体成分応答. 第 74 回日本細菌学会総会 (岡山), 2001 年 4 月 2-4 日. 日本細菌学雑誌 56: 200, 2001.
- 2. 玉井利代子, 菅原俊二, 高田春比古. インターフェロン $\gamma$ によるヒト単球系 THP-1 細胞の CD14/Toll-like receptor 系を介する LPS 応答の増強. 第 74 回日本細菌学会総会 (岡山), 2001 年 4 月 2-4 日. 日本細菌学雑誌 56: 201, 2001.
- 3. Sugawara S., A. Uehara, T. Yamaguchi, K. Kumagai, H. Okamura, and H. Takada. Constitutive Expression of ProIL-18 by Human Oral Epithelial Cells and Induction of Caspase-1-Independent Bioactive IL-18 Secretion by Neutrophil Serine Proteinase, Proteinase 3. 11th International Congress of Immunology. (Stockholm, Sweden), 2001 年 7 月 22-27 日. Scand. J. Immunol. 54 (Suppl. 1): 95 Friday, 2001.
- 4. 菅原俊二. 好中球セリンプロテアーゼ proteinase 3 と LPS 共刺激による上皮細胞からの活性型 IL-18 産生誘導(ワークショップ). 第 66 回日本インターフェロン・サイトカイン学会 (神戸), 2001 年 7 月 13-14 日. 第 66 回日本インターフェロン・サイトカイン学会プログラム・抄録集, p47.
- 5. 上原亜希子, 菅原俊二, 高田春比古. ヒト唾液腺上皮細胞の CD14 発現と好中球プロテアーゼによるその調節. 第 55 回日本細菌学会東北支部総会 (仙台), 2001 年 8 月 23-24 日. 第 55 回日本細菌学会東北支部総会講演要旨集 p21.
- 6. 菅原俊二, 上原亜希子, 半澤和雄, 熊谷勝男, 高田春比古. 好中球 proteinase 3 と LPS との共刺激によるヒト口腔上皮細胞の活性型インターロイキン(IL)-18 産

- 生. 第 43 回歯科基礎医学会総会 (大宮), 2001 年 9 月 19-21 日. 歯基礎誌 43: 530, 2001.
7. 上原亜希子, 萱原俊二, 大工原恭, 高田春比古. 各種サイトカインで前処理したヒト口腔上皮細胞は菌体成分に応答する. 第 43 回歯科基礎医学会総会 (大宮), 2001 年 9 月 19-21 日. 歯基礎誌 43: 611, 2001.
  8. 多田浩之, 萱原俊二, 高橋信博, 島内英俊, 高田春比古. *Porphyromonas gingivalis* のジンジパインによるヒト歯肉線維芽細胞の CD14 分子分解と LPS 不応答性の誘導. 第 43 回歯科基礎医学会総会 (大宮), 2001 年 9 月 19-21 日. 歯基礎誌 43: 614, 2001.
  9. 玉井利代子, 萱原俊二, 高田春比古. LPS とインターフェロン $\gamma$ はヒト単球系 THP-1 細胞の CD14/Toll-like receptor 系を増幅して相乗的に IL-8 を誘導する. 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪), 2001 年 12 月 11-13 日. 日本免疫学会総会・学術集会記録 31: 131, 2001.
  10. 萱原俊二. 口腔粘膜の自然免疫機構. 第 40 回東北大学歯学会 (仙台), 2001 年 12 月 14 日. 東北大歯誌 21: 44-45, 2002.
  11. 多田浩之, 萱原俊二, 今村隆寿, 島内英俊, 高田春比古. *Porphyromonas gingivalis* gingipains によるヒト口腔上皮細胞の ICAM-1 分解. 第 75 回日本細菌学会総会 (横浜), 2002 年 4 月 4-6 日. 日本細菌学雑誌 57: 159, 2002.
  12. 上原亜希子, 萱原俊二, 高田春比古. ヒト唾液中には唾液腺細胞由来の遊離型 CD14 が存在する. 第 75 回日本細菌学会総会 (横浜), 2002 年 4 月 4-6 日. 日本細菌学雑誌 57: 325, 2002.
  13. Sugawara, S., A. Uehara, R. Tamai, and H. Takada. Innate immune responses in oral flora. The 7th Conference of The International Endotoxin Society (Symposium) (Washington, DC, USA), 2002 年 7 月 18-21 日. J. Endotoxin Res. 8 (3): 213, 2002.
  14. Uehara, A., S. Sugawara, and H. Takada. Constitutive expression of CD14 in human salivary glands and secretion as a soluble form into saliva. The 7th Conference of The International Endotoxin Society (Washington, DC, USA), 2002 年 7 月 18-21 日. J. Endotoxin Res. 8 (3): 179-180, 2002.
  15. 横山成邦, 柴田健一郎, 萱原俊二, 高田春比古. 菌体成分のマウス血清サイトカイン誘導活性に対する MDP のプライミング作用は Toll-like receptor (TLR) 2 非依存的に発現する. 第 56 回日本細菌学会東北支部総会 (盛岡), 2002 年 8 月 29-30 日. 第 56 回日本細菌学会東北支部総会講演要旨集 p16.
  16. 萱原俊二, 上原亜希子, 越後成志, 高田春比古. ヒト唾液中に存在する唾液腺細胞由来の遊離型 CD14. 第 44 回歯科基礎医学会総会 (東京), 2002 年 10 月 3-5 日. 歯基礎誌 44: 459, 2002.
  17. 上原亜希子, 萱原俊二, 高田春比古. 好中球 proteinase 3 は PAR-2 を介して口腔上皮細胞を活性化する. 第 44 回歯科基礎医学会総会 (東京), 2002 年 10 月 3-5 日. 歯基礎誌 44: 94, 2002.

18. 小澤亜紀子, 萱原俊二, 上原亜希子, 玉井利代子, 多田浩之, 島内英俊, 高田春比古. ヒト歯肉線維芽細胞のインターロイキン-2 受容体 (IL-2R) bならびにgの発現と IL-2 応答性. 第 44 回歯科基礎医学会総会 (東京), 2002 年 10 月 3-5 日. 歯基礎誌 44: 94, 2002.
19. Sugawara, S., A. Uehara, K. Muramoto, and H. Takada. Neutrophil proteinase 3 activates oral epithelial cells through protease-activated receptor-2. 第 50 回国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 総会・学術大会 (仙台), 2002 年 10 月 30 日, 12 月 1 日. Program and Abstracts of Papers for JADR, p102.
20. 萱原俊二, 上原亜希子, 高田春比古. 好中球 proteinase 3 による protease-activated receptor-2 を介する口腔上皮細胞の活性化. 第 32 回日本免疫学会総会・学術集会 (東京), 2002 年 12 月 4-6 日. 日本免疫学会総会・学術集会記録 32: 32, 2002.
21. 上原亜希子, 萱原俊二, 佐藤光信, 山口高弘, 高田春比古. 唾液腺細胞による遊離型 CD14 の産生とヒト唾液での機能. 第 32 回日本免疫学会総会・学術集会 (東京), 2002 年 12 月 4-6 日. 日本免疫学会総会・学術集会記録 32: 35, 2002.
22. 萱原俊二, 高田春比古. 好中球セリンプロテアーゼによる歯周組織構成細胞活性化のメカニズム. 第 1 回口腔科学フロンティア (東京), 2002 年 12 月 21 日.
23. 上原亜希子, 村本光二, 高田春比古, 萱原俊二. 好中球 proteinase 3 による protease-activated receptor-2 を介するヒト口腔上皮細胞の活性化. 第 23 回東北免疫研究会 (仙台), 2003 年 3 月 7 日.

### (3) 出版物

なし

### 研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし



本報告書収録の学術雑誌等発表論文は本ファイルに登録しておりません。なお、このうち東北大学在籍の研究者の論文で、かつ、出版社等から著作権の許諾が得られた論文は、個別に **TOUR** に登録しております。